

PTO 03-1457

CY=JP DATE=19910228 KIND=A  
PN=03-047097

HYBRIDIZATION METHOD, GENE MUTATION DETECTION METHOD  
USING IT AND APPARATUS THEREOF

[Haiburidaize-shon hoho, kore wo mochiita  
identshi hen'i kenshutsu hoho oyobi sono sochi]

Jiro Tokita, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C. January 2003

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10):	JP
DOCUMENT NUMBER	(11):	03047097
DOCUMENT KIND	(12):	A
PUBLICATION DATE	(43):	19910228
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	01178933
APPLICATION DATE	(22):	19890713
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	C12Q 1/68; C12M 1/00; G01N 27/447; G01N 27/26
PRIORITY COUNTRY	(33):	
PRIORITY NUMBER	(31):	
PRIORITY DATE	(32):	
INVENTOR	(72):	TOKITA, JIRO, ET AL.
APPLICANT	(71):	HITACHI, LTD.
TITLE	(54):	HYBRIDIZATION METHOD, GENE MUTATION DETECTION METHOD USING IT AND APPARATUS THEREOF
FOREIGN TITLE	[54A]:	HAIBURIDAIZE-SHON HOHO, KORE WO MOCHIITA IDENSHI HEN'I KENSHUTSU HOHO OYOBI SONO SOCHI

1. Title of the Invention

Hybridization Method, Gene Mutation Detection Method Using It and Apparatus Thereof

2. Claim

1. A method for hybridizing a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; said method for hybridizing a nucleic acid sample characterized by fixing a nucleic acid probe in an electrophoresis carrier and allowing a nucleic acid sample to migrate into the electrophoresis ["electric" in original] carrier by electrophoresis.
2. A method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; said method for detecting a gene mutation characterized by fixing the nucleic acid probe in an electrophoresis carrier, allowing the nucleic acid sample to migrate in the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, and allowing the above-mentioned nucleic acid sample bonded to the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by electrophoresis to remove it from the above-mentioned electrophoresis carrier.
3. A method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; said method for detecting a gene mutation characterized by fixing the nucleic acid probe in an electrophoresis carrier, allowing the nucleic

---

<sup>1</sup>Number in the margin indicates pagination in the foreign text.

acid sample to migrate into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, then heating the aforesaid electrophoresis carrier, and subsequently allowing the above-mentioned nucleic acid sample bonded to the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by electrophoresis to remove it from the above-mentioned electrophoresis carrier.

4. A method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; said method for detecting a gene mutation characterized by fixing the nucleic acid probe in an electrophoresis carrier, allowing the nucleic acid sample to migrate into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, migrating the above-mentioned nucleic acid sample bonded to the above-mentioned nucleic acid probe by electrophoresis and removing it from the electrophoresis carrier, and further, migrating a labeled nucleic acid probe into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, allowing the above-mentioned labeled nucleic acid probe bonded to

the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by /758  
electrophoresis to remove it from the electrophoresis carrier, and subsequently detecting the label of the labeled nucleic acid probe bonded to the above-mentioned nucleic acid sample.

5. A method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; said method for detecting a gene mutation characterized by fixing the

nucleic acid probe in the electrophoresis carrier, allowing the nucleic acid sample to migrate into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, then heating the aforesaid electrophoresis carrier, subsequently allowing the above-mentioned nucleic acid sample bonded to the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by electrophoresis to remove it from the above-mentioned electrophoresis carrier, and further, allowing a labeled nucleic acid probe to migrate into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, then heating the above-mentioned electrophoresis carrier, subsequently allowing the above-mentioned labeled nucleic acid probe bonded to the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by electrophoresis to remove it from the electrophoresis carrier, and subsequently detecting the label of the labeled nucleic acid probe bonded to the above-mentioned nucleic acid sample.

6. The method for detecting a gene mutation of claim 4 or 5 characterized by the label being a phosphor or a dye, and detecting these labels in the electrophoresis carrier.

7. The method for detecting a gene mutation of claim 4 or 5 characterized by the label being an enzyme, and detecting the phosphor or dye produced by an enzymatic reaction using the concerned enzyme in the electrophoresis carrier, or allowing it to migrate outside the above-mentioned electrophoresis carrier to detect it.

8. An apparatus for detecting a gene mutation using a hybridization

reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; said apparatus for detecting a gene mutation characterized by being provided with an electrophoresis carrier in which the nucleic acid probe is fixed in order to hybridize the nucleic acid sample, a direct current voltage application means for applying a direct current voltage to the electrophoresis carrier to which the above-mentioned nucleic acid probe is fixed through an electrolytic solution on the positive electrode side and an electrolytic solution on the negative electrode side, and a measurement means for measuring the absorption of fluorescence or light in the above-mentioned electrophoresis carrier or above-mentioned electrolytic solution on the positive electrode side.

9. The apparatus for detecting a gene mutation of claim 8 characterized by the measurement means being a means for measuring the absorption of fluorescence or light in the electrolytic solution on the positive electrode side; and providing a membrane through which the electrolytic solutions pass but not the phosphor or the dye in order to concentrate the phosphor or dye in the electrolytic solution on the positive electrode side measured by the aforesaid measurement means.

10. The apparatus for detecting a gene mutation of claim 8 or 9 characterized by being provided with a means for controlling the temperature of the above-mentioned electrophoresis carrier.

11. An electrophoresis carrier on which a nucleic acid probe, which is used in a hybridization method on a nucleic acid sample with a

nucleic acid probe or in a method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe, is fixed.

### 3. Detailed Specifications

(Field of Industrial Utilization)

The present invention relates to a method for hybridizing a nucleic acid sample, a method for detecting a gene mutation using this method and an apparatus thereof, and in particular, a high-speed and easily automated method for detecting a gene mutation.

(Prior Art)

A conventional method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction in which either one of a nucleic acid (DNA or RNA) sample or DNA (or RNA) probe (a DNA (or RNA) fragment having a base sequence complementary with the target DNA (or RNA)) is fixed to a solid phase is disclosed in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, (1983), pp. 278-282.

In this method, a hybridization reaction is performed by transcribing and fixing a DNA fragment samples separated by molecular weight by electrophoresis onto a nitrocellulose membrane and subsequently immersing this membrane in a solution containing a DNA probe. Due to the hybridization reaction, the higher the complementation of the base sequence, the stronger the DNA fragment sample is bonded to the DNA probe and it does not dissociate even at high temperatures. Therefore, washing is performed at a temperature so that when the DNA fragment sample

has perfect complementation with the DNA probe, it does not /759  
dissociate or it dissociates when the complementation is  
incomplete. When the DNA fragment sample has perfect  
complementation with the DNA probe, the DNA probe remains bonded to  
the film as is and is detected, but if it does not, the DNA probe  
is not detected because it is washed away from the membrane. As  
above, in this method, whether or not the DNA fragment sample has  
perfect complementation with the DNA probe can be judged.  
Therefore, by making the DNA probe from a DNA fragment having  
perfect complementation with a normal target gene, whether the  
target gene in the DNA fragment sample is a normal one or an  
abnormal one containing a mutation, such as point mutation,  
insertion or deletion, can be detected.

(Problems Which the Invention Intends to Solve)

There was a problem with the above-mentioned conventional  
method because the reaction rate was slow since the hybridization  
reaction with the DNA fragment sample fixed to the nitrocellulose  
membrane (solid phase) occurred by passive dispersion of the DNA  
probe in solution. There was an additional problem because actions  
which were difficult for automation of injection and elimination of  
the solution was contained at the time of the reaction or washing.

The object of the present invention is to obtain a high-  
speed, easily automated hybridization method wherein the  
hybridization reaction rate is fast, there are no actions which are  
difficult for automation of the injection, elimination, and the



like of a solution, and a method for detecting a gene mutation using this method and an apparatus used therein.

(Means Used to Solve the Problems)

In order to achieve the above-mentioned object, in the present invention, the hybridization reaction and washing are performed by fixing the DNA probe in the electrophoresis carrier, arranging two electrodes above and below that carrier with the aid of a buffer, and the nucleic acid fragment sample and the like are forced to migrate by electrophoresis.

Namely, the present invention is a method for hybridizing a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; this method for hybridizing a nucleic acid sample characterized by fixing a nucleic acid probe in an electrophoresis carrier and allowing a nucleic acid sample to migrate into the electrophoresis [electric in original] carrier by electrophoresis. In this hybridization method, the nucleic acid sample was forced to migrate over the electrophoresis carrier in which the DNA probe is fixed; hence, the hybridization reaction is faster than in the above-mentioned conventional method, and this reaction can be completed in a short time.

Furthermore, the present invention is a method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; this method for detecting a gene mutation characterized by fixing the nucleic acid probe in an electrophoresis carrier, allowing the nucleic acid sample to

migrate in the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, and allowing the above-mentioned nucleic acid sample bonded to the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by electrophoresis to remove it from the above-mentioned electrophoresis carrier.

The above-mentioned method for detecting a gene mutation can be performed by using two kinds of nucleic acid probes, i.e., a nucleic acid probe fixed to an electrophoresis carrier (an immobilized probe) and a 2<sup>nd</sup> labeled nucleic acid probe (a labeled probe) further hybridized with a nucleic acid sample bonded to the aforesaid immobilized probe. That is, this method for detecting a gene mutation can be performed by fixing the nucleic acid probe in an electrophoresis carrier, allowing the nucleic acid sample to migrate into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, migrating the above-mentioned nucleic acid sample bonded to the above-mentioned nucleic acid probe by electrophoresis and removing it from the electrophoresis carrier, and further, migrating a labeled nucleic acid probe into the electrophoresis carrier by electrophoresis, performing a hybridization reaction, allowing the above-mentioned labeled nucleic acid probe bonded to the above-mentioned nucleic acid probe to migrate by electrophoresis to remove it from the electrophoresis carrier, and subsequently detecting the label of the labeled nucleic acid probe bonded to the above-mentioned nucleic acid sample.

Moreover, after performing the hybridization reaction, a process for heating the electrophoresis carrier can be added to each above-mentioned method. The heating temperature is preferably a temperature so as not to dissociate the nucleic acid sample when it has perfect complementation with the nucleic acid probe and dissociate it when there is no complementation or complementation is imperfect. This temperature varies widely depending on the lengths of the nucleic acid sample and the nucleic acid probe, the base sequence, and the mutation in the gene to be detected, but 55°C is preferable for example when a point mutation in a  $\beta$ -globin gene is detected with a nucleic acid probe having a 19-base length. Then, by heating this electrophoresis carrier, the accuracy of the method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction between the nucleic acid probe and the nucleic acid sample can be increased. /760

Any detectable labeling substance can be used for the substance for labeling the above-mentioned labeled nucleic acid probe. It can be a radioisotope, such as  $^{32}\text{P}$ , but preferably, a phosphor, dye, or an enzyme which forms a phosphor or dye in the reaction can be used. Fluorescein isothiocyanate (FITC), esterase, and the like are used as specific examples. Then, measurement of this phosphor or dye can be performed for either allowing the phosphor or dye to migrate into the above-mentioned electrophoresis carrier or outside the above-mentioned electrophoresis carrier by electrophoresis.

Furthermore, the present invention pertains to an apparatus for detecting a gene mutation for carrying out the above-mentioned method for detecting a gene mutation; it is an apparatus for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe; this apparatus for detecting a gene mutation characterized by being provided with an electrophoresis carrier in which the nucleic acid probe is fixed in order to hybridize the nucleic acid sample, a direct current voltage application means for applying a direct current voltage to the electrophoresis carrier to which the above-mentioned nucleic acid probe is fixed through an electrolytic solution on the positive electrode side and an electrolytic solution on the negative electrode side, and a measurement means for measuring the absorption of fluorescence or light in the above-mentioned electrophoresis carrier or above-mentioned electrolytic solution on the positive electrode side. Moreover, this apparatus for detecting a gene mutation can be provided with a membrane through which the electrolytic solutions pass but not the phosphor or the dye in order to concentrate the phosphor or dye in the electrolytic solution on the positive electrode side measured by the aforesaid measurement means when the measurement means is a means for measuring the absorption of fluorescence or light in the electrolytic solution on the positive electrode side. This membrane can be any membrane provided with the above-mentioned functions, but a porous glass membrane made of quartz can be used,

for example.

In addition, this apparatus for detecting a gene mutation can be provided with a control means for controlling the temperature of the above-mentioned electrophoresis carrier.

Furthermore, the present invention pertains to an electrophoresis carrier on which the above-mentioned nucleic acid probe, which is used in a hybridization method on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe or in a method for detecting a gene mutation using a hybridization reaction on a nucleic acid sample with a nucleic acid probe, is fixed.

(Operation)

A DNA fragment sample is forced to migrate into the carrier by applying a direct current across two electrodes after adding the DNA fragment sample to the electrophoresis carrier. Thus, the hybridization reaction can be made faster than when the DNA fragment sample is dispersed passively.

Moreover, a DNA fragment sample not bonded or bonded weakly due to the hybridization reaction is removed by electrophoresis. Thus, a method suitable for automation can be realized without needing a washing operation by injection and elimination of a solution, and the like.

Furthermore, measurement of the fluorescence or light from the substance for labeling the hybridization reactant can be performed in either the above-mentioned electrophoresis carrier or the electrolytic solution on the positive electrode side. In addition,

when measurement is done in the latter electrolytic solution on the positive electrode side, the sensitivity of the measurement is enhanced by providing a membrane which concentrates the phosphor or dye.

(Practical Examples)

The present invention will now be explained more specifically through the practical examples. However, the present invention is not limited by these practical examples.

Practical Example 1

This practical example is explained through Figures 1(a) and (b).

First of all, an electrophoresis carrier 1 in which a DNA probe is fixed is prepared as follows. A DNA fragment (3'-GAGGACTCCTCTTCAGACG-5') perfectly complementary to the sequence of bases 14 to 32 from the 5' terminal of a human  $\beta$ -globin gene was synthesized for the DNA probe in a phosphoamide method that is currently used widely in the industry. However, in the final synthesis step, that is, the step in which the guanine (G) of the 5' terminal is added, an amino group was introduced at the 5' terminal of the DNA fragment in a method by L.M. Smith, et al. in which deoxyguanosine having an amino group at the 5' terminal was 761 used instead of deoxyguanosine. Next, this DNA probe was prepared by high-performance liquid chromatography (HPLC), subsequently added to an aqueous 2.5% acrolein solution, and allowed to react

for 30 minutes under cooling with ice. This was dialyzed well with a PBS buffer, after which a 5% acrylamide-N,N'-methylene bisacrylamide solution (acrylamide:N,N'-methylene bisacrylamide = 20:1), N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine with a final concentration of 0.08%, and ammonium persulfate with a final concentration of 0.1% were further added, injected into a glass tube 2, and gelled to get the electrophoresis carrier 1.

The  $\beta$ -globin gene ( $\beta^A$ ) of a healthy person and the  $\beta$ -globin gene ( $\beta^S$ ) of a patient with sickle cell anemia wherein the 20<sup>th</sup> adenosine (A) from the 5' terminal mutated (point mutation) to thymine (T) and was cleaved with the restriction enzyme BamHI (a fragment of about 1,800 base pairs contained in the vicinity of the 5' terminal of the  $\beta$ -globin gene) were used for the DNA fragment samples.

The above-mentioned DNA fragment samples were subjected to heat denaturation to make a single strand DNA, which were then injected into the upper end of the electrophoresis carrier 1 in which a DNA probe maintained at 45°C by a temperature controller 3 was fixed, and a voltage from a direct current power source 10 was applied across the negative electrode 6 in an upper electrolytic solution bath 4 and the positive electrode 9 in a lower electrolytic solution bath 7. Thus, the DNA fragment samples are forced by electrophoresis into the electrophoresis carrier 1; hence, the hybridization reaction can proceed faster than when the

samples are dispersed passively without performing electrophoresis.

Next, the temperature of the electrophoresis carrier 1 was changed to 55°C by using the temperature controller 3, a voltage was subsequently applied across the two electrodes 6 and 9 again, and the DNA fragment sample dissociated because a perfect complementation with the DNA probe was not maintained was removed by electrophoresis.

Furthermore, a second DNA probe labeled with esterase was injected into the upper end of the electrophoresis carrier 1 after bringing the temperature of the electrophoresis carrier back to 45°C and this was subjected to electrophoresis. This DNA probe (labeled probe) was such that the 5' terminal of the DNA fragment (3'-CCACTTGACCTACTTCAAC-5') synthesized in a phosphoamide method in the same way as the probe fixed to the electrophoresis carrier 1 (immobilized probe) was labeled with esterase, but it is complementary to a site different than the immobilized probe, that is, the sequence of bases 53 to 72 from the 5' terminal of the  $\beta$ -globin gene. Therefore, if the DNA fragment sample is bonded to the immobilized probe and remains in the electrophoresis carrier 1, the labeled probe is bonded to another site of the DNA fragment sample and also remains in the electrophoresis carrier 1, but if the DNA fragment sample does not remain, the labeled probe passes through without remaining in the electrophoresis carrier 1.

Lastly, FDA (fluorescein diacetate), which is a matrix for the



labeling enzyme esterase, was introduced into the upper end of the electrophoresis carrier 1 and subjected to electrophoresis in the same way, and the fluorescence of the fluorescent substance, fluorescein, produced by an enzymatic reaction was measured in the electrophoresis carrier 1.

A 490 nm wavelength light obtained by passing the light emitted from a xenon lamp light source 11 through an interference filter 12, subsequently condensed by a lens 13 was selected, and the electrophoresis carrier 1 was irradiated with this excited light. Light with a wavelength in the vicinity of 510 nm was selectively detected by a photomultiplier 20 after passing through a lens 17, cut-off filter 18, and interference filter 19 from a direction 90° to the excited light. Moreover, a window 16 was provided on the opposite side of a light incident window 14, and the excited light that passed through the electrophoresis carrier 1 was guided to the outside; hence, influence by diffused light was minimized. The output from the photomultiplier 20 was amplified by an amplifier 21 and subsequently recorded by a recorder 22.

As a result of measurement, when the DNA fragment sample was a  $\beta$ -globin gene ( $\beta^A$ ) of a healthy person which did not contain a mutation and it had perfect complementation with the immobilized DNA probe, fluorescence was detected. However, when the DNA fragment sample was a fragment of  $\beta$  globin gene ( $\beta^S$ ) of a patient with sickle cell anemia containing a mutation (point mutation) and

it had all but a complementation of only one base with the immobilized DNA probe, fluorescence was not detected. Upon performing the same measurement for confirmation by adding the immobilized DNA probe to a fragment with perfect complementation to the  $\beta^5$  gene (3'-GAGGACACCTCTTGAGACG-5'), fluorescence was not detected when the DNA fragment sample was a fragment of the  $\beta^A$  gene and fluorescence was detected when it was a fragment of the  $\beta^3$  gene. In this way, the gene fragment containing a mutation and the gene fragment not containing a mutation could be discriminated as to whether or not fluorescence could be detected; hence, a mutation (point mutation) in the  $\beta$ -globin gene fragment could be detected.

/762

Moreover, an enzyme (esterase) was used as the labeling substance in this practical example to measure the fluorescence of the FDA produced by an enzymatic reaction, but a fluorescent substance, such as FITC, can be used as the labeling substance, and the fluorescence thereof can be measured directly without using an enzyme or enzymatic reaction.

According to this practical example as above, a high-speed and easily automated method for detecting a gene mutation and an apparatus could be realized.

#### Practical Example 2

The 2<sup>nd</sup> practical example will be explained next through Figure 2. The difference between this practical example and Practical Example 1 is that the fluorescence of the fluorescent substance,

fluorescein, is measured in the lower electrolytic solution 8, not in the electrophoresis carrier 1. In the last step of the aforesaid practical example, the FDA migrated into the electrophoresis carrier 1 by electrophoresis, and the fluorescent substance, fluorescein, produced by an enzymatic reaction by continuing electrophoresis further was subjected to electrophoresis in the lower electrolytic solution 8. And so, the fluorescence of the fluorescein was measured in the lower electrolytic solution by using the apparatus shown in Figure 2.

According to this practical example, in addition to the same effects as the aforesaid practical example, the fluorescence of the fluorescein is measured not in the electrophoresis carrier in which there is a lot of diffused light and interfering fluorescence, but in an electrolytic solution in which there is hardly any of such light, there is an effect because a highly sensitive fluorescence measurement is possible.

#### Practical Example 3

The 3<sup>rd</sup> practical example will be explained next through Figure 3. The difference between this practical example and Practical Example 2 was that it was constituted with a small- capacity electrolytic solution bath 25 by arranging a porous glass membrane 24 mounted on a membrane holder 23 made of acrylic between the lower end of the electrophoresis carrier 1 and the lower electrolytic solution 8. The above-mentioned porous glass membrane

24 was used to react tetramethoxysilane with methanol in an aqueous solvent in a sol-gel method. It is a quartz glass having properties where the electrolyte in the electrolytic solution permeates into it, but phosphor does not. Therefore, the phosphor, FDA, produced by an enzymatic reaction is concentrated in the small-capacity electrolyte bath 25. In this practical example, the electrolytic solution containing the phosphor concentrated in the above-mentioned process passed through a guide hole 26 and was guided to a fluorescence cell 28 by using a pipette 27. The pipette 27 was held by a vertical rotating mechanism 29. The fluorescence of the phosphor in the fluorescence cell 28 was measured by the same optical system as shown in Figure 2.

According to this practical example, in addition to the same effect as in Practical Example 2, there is an effect where a highly sensitive fluorescence measurement is also possible because the fluorescent substance, FDA, is concentrated in a small volume of electrolytic solution.

#### (Advantages of the Invention)

According to the present invention, the DNA fragment sample is forced to migrate into the electrophoresis carrier by electrophoresis; hence, the hybridization reaction can be made faster than when it is passively diffused in a conventional method using nitrocellulose membrane, and it can be finished in a short time. Moreover, a DNA sample bonded or weakly bonded by a

hybridization reaction can be removed easily by electrophoresis without using a washing operation by injection, elimination, and the like of a solution. Therefore, according to the present invention, a high-speed and easily automated method for detecting a gene mutation can be realized. Furthermore, in the present invention, the measurement sensitivity can be enhanced by concentrating the phosphor or light of the labeling substance.

#### 4. Brief Description of the Figures

Figures 1(a) and (b) are a longitudinal sectional view and cross sectional view of the apparatus used in the first practical example of the present invention, respectively; Figure 2 is a longitudinal sectional view of the apparatus used in the second practical example of the present invention; and Figure 3 is a partially enlarged longitudinal sectional view of the apparatus used in the third practical example of the present invention.

1: electrophoresis carrier; 2: glass tube; 3: temperature controller; 4: upper electrolytic solution bath; 5: upper (negative electrode side) electrolytic solution; 6: negative electrode; 7: lower (positive electrode side) electrolytic solution bath; 8: lower (positive electrode side) electrolytic solution; 9: positive electrode; 10: direct current power source; 11: light source; 12, 19: interference filters; 13, 17: lenses; 14: light incident window; 15: detection window; 16: window; 18: cut-off filter; 20: photomultiplier; 21: amplifier; 22: recorder; 23: membrane holder; 24: porous glass membrane; 25: small-capacity electrolytic solution

bath; 26: guide hole; 27: pipette; 28: fluorescence cell; 29:  
vertical rotating mechanism

Figure 1

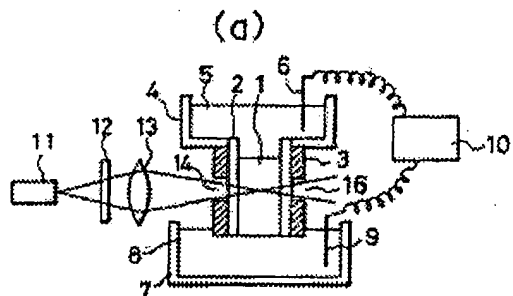


Figure 2

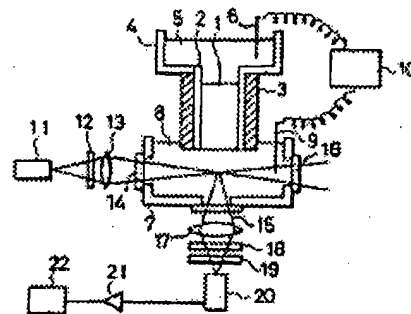
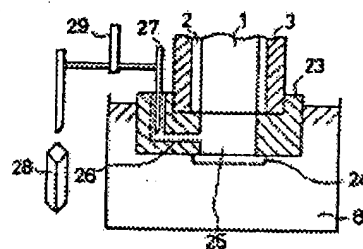


Figure 3



## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-47097

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)2月28日

C 12 Q 1/68  
C 12 M 1/00  
G 01 N 27/447A 6807-4B  
A 8717-4B

7235-2G G 01 N 27/26 3 0 1 A

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ハイブリダイゼーション方法、これを用いた遺伝子変異検出方法及びその装置

⑯ 特 願 平1-178933

⑰ 出 願 平1(1989)7月13日

⑱ 発 明 者 橋 田 二 郎 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 永 井 啓 一 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 時 永 大 三 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉒ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ハイブリダイゼーション方法、これを用いた  
遺伝子変異検出方法及びその装置

## 2. 特許請求の範囲

1. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめることを特徴とする核酸試料のハイブリダイゼーション方法。

2. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

3. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼー

ション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、次いで前記電気泳動担体を加温した後、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

4. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去し、さらに標識核酸プローブを電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記標識核



酸プローブを電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去した後、上記核酸試料と結合した標識核酸プローブの標識を検出することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

5. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、次いで前記電気泳動担体を加温した後、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去し、さらに標識核酸プローブを電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、次いで上記電気泳動担体を加温した後、上記核酸プローブと結合しなかった上記標識核酸プローブを電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去した後、上記核酸試料と結合した標識核酸プローブの標識を検出することを特徴とする

9. 計測手段が正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する手段であって、前記計測手段によって計測される正極側電解液中の蛍光体又は色素を濃縮するための、電解液は通過するが蛍光体又は色素は透過しない膜を設けたことを特徴とする請求項8記載の遺伝子変異検出装置。

10. 上記電気泳動担体の温度をコントロールする手段を具備したことを特徴とする請求項8又は9記載の遺伝子変異検出装置。

11. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法又は核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法に用いる核酸プローブを固定した電気泳動担体。

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は核酸試料のハイブリダイゼーション方法、この方法を用いた遺伝子変異検出方法及びその装置に関し、特に高速で自動化容易な遺伝子変異検出方法及び装置に関する。

遺伝子変異検出方法。

6. 標識は蛍光体又は色素であり、これらを電気泳動担体中で検出することを特徴とする請求項4又は5記載の遺伝子変異検出方法。
7. 標識は酵素であり、当該酵素による酵素反応によって生成する蛍光体又は色素を電気泳動担体中で検出するか、あるいは電気泳動によって上記電気泳動担体中から外に移動せしめて検出することを特徴とする請求項4又は5記載の遺伝子変異検出方法。
8. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出装置において、核酸試料をハイブリダイゼーションさせるための核酸プローブを固定した電気泳動担体と、上記核酸プローブを固定した電気泳動担体に正極側電解液と負極側電解液を介して直流電圧を印加する直流電圧印加手段と、上記電気泳動担体中又は上記正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する計測手段とを具備したことを特徴とする遺伝子変異検出装置。

(従来の技術)

核酸 (DNA又はRNA) 試料又はDNA (RNA) プローブ (標的DNA (RNA) と相補的な塩基配列を持つDNA (RNA) 断片) のいずれか一方を固相に固定したハイブリダイゼーション反応を用いる従来の遺伝子変異検出法は、プロシーディングス オブ ナチュラルアカデミー オブ サイエンス ユー エス エー, 80巻 (1983年) 第278頁から282頁 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, (1983), pp.278 ~282) に記載されている。

この方法は、まず、電気泳動によって分子量分離したDNA断片試料をニトロセルロース膜上に転写、固定した後、この膜をDNAプローブを含む溶液に浸してハイブリダイゼーション反応を行なう。ハイブリダイゼーション反応では、塩基配列の相補性が高い程、DNA断片試料とDNAプローブは強く結合し、高い温度でも解離することがない。そこで、次に、DNA断片試料がDNAプローブと完全な相補性をもつ場合には解離せず、

相補性がないか又は相補性が不完全な場合には解離するような温度で洗浄を行なう。DNA断片試料がDNAプローブと完全な相補性を持つものである場合には、DNAプローブは膜に結合したまま残って検出されるが、そうでない場合には、DNAプローブは膜から洗い流されて検出されない。以上のように、この方法では、DNA断片試料がDNAプローブと完全な相補性を持つか否かを判定できる。したがって、正常な標的遺伝子と完全な相補性を持つDNA断片をDNAプローブとすることにより、DNA断片試料中の標的遺伝子が正常なものか、あるいはポイントミューテーション、挿入、欠失等の変異を含む異常なものかを判定でき、遺伝子の変異を検出できる。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記の従来法では、ハイブリダイゼーション反応がニトロセルロース膜（固相）に固定されたDNA断片試料と、溶液中のDNAプローブの受動的拡散によって起こるため、反応速度が遅いという問題点があった。また、反応時及び洗浄時には、

各々の溶液の注入、排出という自動化しにくい動作が含まれているという問題点があった。

本発明の目的は、ハイブリダイゼーションの反応速度が速く、しかも溶液の注入、排出等の自動化しにくい動作の少ない、高速で自動化容易なハイブリダイゼーション方法、該方法を用いた遺伝子変異検出法及びそれに用いる装置を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記目的を達成するために、本発明では、DNAプローブを電気泳動担体に固定し、その上下に緩衝液を介して2つの電極を配置して、電気泳動により核酸断片試料等を強制的に移動させて、ハイブリダイゼーション反応や洗浄を行なうようにした。

即ち、本発明は、核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめることを特徴とする核酸試料のハイブリダイゼーション方法で

ある。このハイブリダイゼーション方法によれば、DNAプローブを固定した電気泳動担体上を核酸試料を強制的に移動させるものであるから、ハイブリダイゼーション反応が、上記従来法に比して速く、この反応を短時間で完了することができる。

さらに本発明は、核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめ上記電気泳動担体中から除去することを特徴とする遺伝子変異検出方法である。

上記遺伝子変異検出法においては、2種類の核酸プローブ、即ち、電気泳動担体に固定する核酸プローブ（固定化プローブ）と、前記固定化プローブに結合した核酸試料に更にハイブリダイズする標識化された第2の核酸プローブ（標識プローブ）を用いて行うことができる。即ち、この遺伝

子変異検出法は、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去し、さらに標識核酸プローブを電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記標識核酸プローブを電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去した後、上記核酸試料と結合した標識核酸プローブの標識を検出することにより行うことができる。

また、上記いずれの方法においてもハイブリダイゼーション反応を行わせた後、電気泳動担体を加温する工程を加えることができる。加温する温度は、核酸試料が核酸プローブと完全な相補性をもつ場合には解離せず、相補性がないか又は相補性が不完全な場合には解離するような温度が好ましい。この温度は、核酸試料と核酸プローブの長

さと塩基配列及び検出しようとする遺伝子の変異によって種々異なるが、例えば、 $\beta$ -グロビン遺伝子中のポイントミューテーションを19塩基長の核酸プローブで検出する場合は55℃が好ましい。そして、この電気泳動担体の加温により、核酸プローブと核酸試料とのハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法の精度を高めることができる。

上記標識核酸プローブの標識物質としては、検出可能なものであればいずれでもよく、 $^{32}\text{P}$ 等のラジオアイソトープでもよいが、好ましくは蛍光体又は色素或いは反応により蛍光体又は色素を生成する酵素が用いられ、具体的には例えばフルオレセイン イソチアシンネート (FITC)、エステラーゼ等が用いられる。そして、これらの蛍光体又は色素の計測は、上記電気泳動担体中あるいは電気泳動により上記電気泳動担体中から外に移動せしめたものについてのいずれにおいても行うことができる。

さらに、本発明は、上記遺伝子変異検出方法を

動担体の温度をコントロールするためのコントロール手段を備えることができる。

さらに本発明は、上記核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法又は核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法に用いる核酸プローブを固定した電気泳動担体に係るものである。

#### 〔作用〕

電気泳動担体の上面にDNA断片試料を添加した後、2つの電極間に直流電圧を印加して、DNA断片試料を強制的に担体中に移動させる。これにより、DNA断片試料を受動的に拡散させる場合よりも、ハイブリダイゼーション反応を速くできる。

また、ハイブリダイゼーション反応で結合しなかったか又は結合が弱かったDNA断片試料を電気泳動により除去する。これにより、溶液の注入、排出等による洗浄操作が不要な、自動化に適した方法を実現できる。

さらに、ハイブリダイゼーション反応物の標識

実施するための遺伝子変異検出装置に係わり、核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出装置において、核酸試料をハイブリダイゼーションさせるための核酸プローブを固定した電気泳動担体と、上記核酸プローブを固定した電気泳動担体に正極側電解液と負極側電解液を介して直流電圧を印加する直流電圧印加手段と、上記電気泳動担体中又は上記正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する計測手段とを具備したことを特徴とする遺伝子変異検出装置である。また、この遺伝子変異検出装置は、計測手段が、正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する手段である場合は、前記計測手段によって計測される正極側電解液中の蛍光体又は色素を濃縮するための、電解液は通過するが蛍光体又は色素は透過しない膜を設けることができる。この膜は上記機能を備えるものであればいずれでもよいが、例えば石英製のポーラスガラス膜が用いられる。

また、この遺伝子変異検出装置には上記電気泳

動物質からの蛍光又は光の吸収の計測は上記電気泳動担体あるいは正極側の電解液中のいずれにおいても行うことができ、また、後者の正極側の電解液中で計測する場合は、蛍光体又は色素を濃縮する膜を備えることにより計測の感度が高められる。  
〔実施例〕

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により限定されるものでない。

#### 実施例1

本実施例を第1図(a)、(b)により説明する。

まず、DNAプローブを固定した電気泳動担体1は以下のようにして調製する。DNAプローブは、ヒト $\beta$ -グロビン遺伝子の5'末端から14~32番目の塩基配列と完全に相補的なDNA断片(3'-GAGGACTCCTCTCAGACG-5')を、現在広く用いられているフォスフォアミダイド法で合成した。ただし、合成の最終ステップ、すなわち5'末端のグアニン(G)を付加するステップでは、デオキシグアニンのかわりに5'末端にアミノ基をもつデオキ

シグアノシンを用いるL.M.Smithらの方法により、DNA断片の5'末端にアミノ基を導入した。次に、このDNAブローブを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製した後、2.5%アクロレイン水溶液に加えて氷冷下30分間反応させた。これをPBS緩衝液でよく透析した後、さらに5%アクリルアミド-N, N'-メチレンビスアクリルアミド溶液(アクリルアミド:N, N'-メチレンビスアクリルアミド=20:1)、最終濃度0.08%のN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、最終濃度0.1%の過硫酸アンモニウムを加えてガラス管2に注入し、ゲル化させて電気泳動担体1とした。

DNA断片試料としては、変異を含まない正常人のβ-グロビン遺伝子(β<sup>A</sup>)と5'末端から20番目のアデノシン(A)がチミン(T)に変異した(ポイントミューテーション)、鎌状赤血球貧血症患者のβ-グロビン遺伝子(β<sup>S</sup>)を制限酵素BamHIで切断したもの(β-グロビン遺伝子の5'末端付近を含む、長さ約1800塩基対の断片)を使用した。

上記DNA断片試料を加熱変性させて一本鎖D

NAとしてから、温度コントローラ3によって45℃に保たれているDNAブローブを固定した電気泳動担体1の上端に注入し、上部電解液槽4中の負極6と下部電解液槽7中の正極9の間に直流電源10で電圧を印加した。これにより、DNA断片試料は電気泳動担体1の中へ強制的に電気泳動されるため、電気泳動を行わずに受動的に拡散させる場合に比べて、ハイブリダイゼーション反応を速く進めることができる。

次に、電気泳動担体1の温度を温度コントローラ3によって55℃に変更してから、再び2つの電極6, 9の間に電圧を印加し、DNAブローブと完全な相補性を持たないために解離したDNA断片試料を電気泳動により除去した。

さらに、電気泳動担体の温度を45℃にもどしてから、エステラーゼで標識した第二のDNAブローブを電気泳動担体1の上端に注入し、電気泳動した。このDNAブローブ(標識ブローブ)は、電気泳動担体1に固定したブローブ(固定化ブローブ)と同様にフォスフォアミダイド法で合成し

たDNA断片(3'-CCACTTGCACCTACTTCAAC-5')の5'末端をエステラーゼで標識したものであるが、固定化ブローブとは異なる部位、すなわちβ-グロビン遺伝子の5'末端から53~72番目の塩基配列に相補的である。したがって、DNA断片試料が固定化ブローブに結合して電気泳動担体1中に残っていれば、標識ブローブもDNA断片試料の別の部位に結合して電気泳動担体1中に残るが、DNA断片試料が残っていなければ、標識ブローブは電気泳動担体1中に残らず通過する。

最後に、標識酵素エステラーゼの基質であるFDA(フルオレセインジアセテート)を同様に電気泳動担体1の上端に注入して電気泳動した後、酵素反応で生じた蛍光物質フルオレセインの蛍光を、電気泳動担体1中で測定した。

キセノンランプの光源11から出た光を干渉フィルター12に通して490nmの波長の光を選択した後、レンズ13で集光して電気泳動担体1に励起光を照射した。励起光に対して90°の方向から、レンズ17、カットオフフィルター18、干渉フィルター19

を通して、510nm近傍の波長の光を選択的にフォトマル20で検出した。なお、入射窓14の反対側に窓15を設け、電気泳動担体1を通過した励起光を外部に導くことにより、散乱光の影響を少なくした。フォトマル20の出力は増幅器21で増幅した後、レコーダ22で記録した。

測定の結果、DNA断片試料が変異を含まない正常人のβ-グロビン遺伝子(β<sup>A</sup>)の断片で、固定化DNAブローブと完全な相補性をもつ場合には、蛍光が検出されたが、DNA断片試料が変異(ポイントミューテーション)を含む鎌状赤血球貧血症患者のβ-グロビン遺伝子(β<sup>S</sup>)の断片で、固定化DNAブローブと1塩基だけ相補性をもたない場合には、蛍光は検出されなかった。確認のために、固定化DNAブローブをβ<sup>A</sup>遺伝子に完全な相補性をもつもの(3'-GAGGACACCTCTTCAGACG-5')にかえて同様の測定を行なったところ、DNA断片試料がβ<sup>A</sup>遺伝子の断片の場合には蛍光が検出されず、β<sup>S</sup>遺伝子の断片の場合には蛍光が検出された。このように、変異を含む遺伝子断片

と含まない遺伝子断片を、蛍光が検出されるか否かによって区別できるため、 $\beta$ -グロビン遺伝子断片中の変異（ポイントミューテーション）を検出することができた。

なお、本実施例では標識物質として酵素（エステラーゼ）を用い、酵素反応によって生成するPDAの蛍光を測定したが、標識物質としてFITC等の蛍光物質を用い、酵素や酵素反応を用いずに、直接その蛍光を測定してもよい。

以上のように、本実施例により、高速で自動化容易な遺伝子変異検出法及び装置を実現できた。

#### 実施例2

次に、第2の実施例を第2図により説明する。本実施例と実施例1の違いは、蛍光物質フルオレセインの蛍光を、電気泳動担体1中ではなく、下部電解液8中で測定するところにある。前記実施例の最後のステップで、FDAを電気泳動により電気泳動担体1中に移動させた後、さらに電気泳動を続けて酵素反応で生じた蛍光物質フルオレセインを下部電解液8中に泳動させた。そして、フル

れた蛍光体を含む電解液をガイド穴26を通してビベット27を用いて蛍光セル28に導いた。ビベット27は回転上下機構29に保持した。蛍光セル28中の蛍光体は、第2図に示したのと同様な光学系で蛍光計測した。

本実施例によれば、実施例2と同様の効果に加えて、蛍光物質FDAを小容積の電解液中に濃縮できるため、さらに高感度な蛍光測定が可能であるという効果がある。

#### （発明の効果）

本発明によれば、DNA断片試料を電気泳動により強制的に電気泳動担体中に移動させるので、従来のニトロセルロース膜で用いた方法で受動的に拡散させる場合よりも、ハイブリダイゼーション反応を速くでき、短時間で完了できる。また、ハイブリダイゼーション反応で結合しなかったか又は結合が弱かったDNA試料を、溶液の注入、排出等による洗浄操作を用いずに、電気泳動によって容易に除去することができる。したがって、本発明によれば高速で自動化容易な遺伝子変異検

オレセインの蛍光を第2図に示す装置を用いて、下部電解液中で測定した。

本実施例によれば、前記実施例と同様の効果に加えて、散乱光と妨害蛍光の大きい電気泳動担体中ではなく、これらの小さい電解液中でフルオレセインの蛍光を測定するので、高感度な蛍光測定が可能であるという効果がある。

#### 実施例3

次に、第3の実施例を第3図により説明する。本実施例と実施例2の違いは、電気泳動担体1の下端と下部電解液8の間にアクリル製の膜保持具23に取り付けたポーラスガラス膜24を配置することにより、小容積の電解液槽25を構成した点にある。上記ポーラスガラス膜24は、ゾルゲル法でテトラメトキシシランをメタノールと水溶液中で反応させたもので、電解液中の電解質は透過させるが、蛍光体は透過させないという性質をもつ石英ガラスである。したがって、酵素反応によって生成した蛍光体FDAは小容積の電解液槽25中に濃縮される。本実施例では、上記過程によって濃縮さ

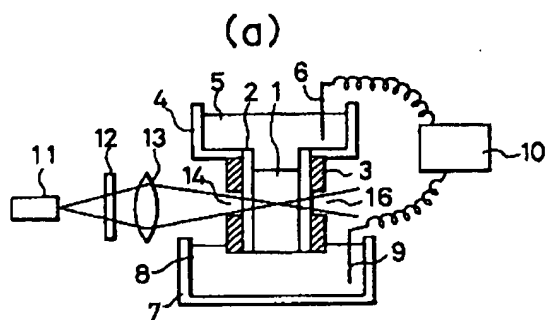
出方法を実現できる。更に本発明は、標識物質の蛍光体又は色素を濃縮することにより計測感度を高めることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

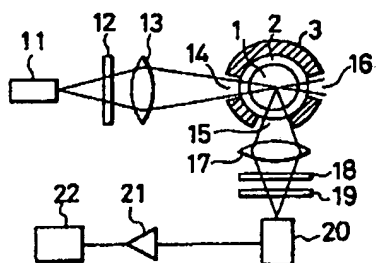
第1図(a)、(b)は各々本発明の第一の実施例で用いた装置の縦断面図と横断面図、第2図は本発明の第二の実施例で用いた装置の縦断面図、第3図は本発明の第三の実施例で用いた装置の縦断面図の一部拡大図である。

1…電気泳動担体、2…ガラス管、3…温度コントローラ、4…上部電解液槽、5…上部（負極側）電解液、6…負極、7…下部（正極側）電解液槽、8…下部（正極側）電解液、9…正極、10…直流電源、11…光源、12、19…干渉フィルター、13、17…レンズ、14…入射窓、15…検出窓、16…窓、18…カットオフフィルター、20…フォトマル、21…増幅器、22…レコーダー、23…膜保持具、24…ポーラスガラス膜、25…小容積の電解液槽、26…ガイド穴、27…ビベット、28…蛍光セル、29…回転上下機構。

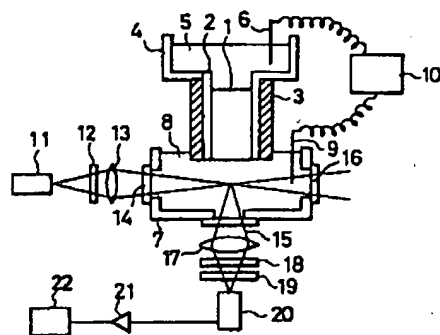
第 1 図



(b)



第 2 図



第 3 図

